

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22128002

研究課題名（和文）少数遺伝子変化による新奇複合適応形質進化の分子機構解明

研究課題名（英文）Evolutionary mechanisms of novel complex evolutionary traits with small number of genes

研究代表者

長谷部 光泰（Hasebe, Mitsuyasu）

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授

研究者番号：40237996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 112,600,000円

研究成果の概要（和文）：個々の形質進化は適応的でないが、いくつかの形質進化が積み重なることで初めて適応的になる進化（新奇複合適応形質進化）の仕組みはよくわかっていない。本研究では、新奇複合適応形質進化の例として主に下記の研究を行った。（1）サラセニアの捕虫葉は平らな形の葉の特定の場所で細胞分裂の方向を変えるという細胞レベルでの変化の結果として引き起こされていることがわかった。（2）フクロユキノシタのゲノム解読を行い、捕虫葉特異的に発現している遺伝子を同定し捕虫葉形成遺伝子候補を同定した。（3）食虫植物の消化酵素は特定の耐病性遺伝子が繰り返し用いられて進化し、消化液環境に適応して収斂進化していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The theory of natural selection and the neutral theory of molecular evolution are powerful concepts in evolutionary biology. However, even with such theories, there still remain unexplained phenomena, one of which is the evolution of complexity. We studied (1) evolution of *Sarracenia purpurea* pitcher leaves, (2) Genome sequence of *Cephalotus follicularis* and evolution of digestive enzymes, (3) Convergent evolution of digestive enzymes with adaptation to fluid environment, and so on.

研究分野：進化学

キーワード：複合適応形質 進化 食虫植物 フクロユキノシタ 収斂 クルミホソガ 寄主転換

1. 研究開始当初の背景

個々の形質進化は適応的でないが、いくつかの形質進化が積み重なることによって初めて適応的になるような進化(新奇複合適応形質進化)の仕組みはよくわかっていない。我々は以下の3つの実験系において、少数遺伝子の進化によって新奇複合適応形質が進化するのではないかと示唆を得た。(1)食虫植物の食虫性進化:食虫植物が進化するには、捕虫葉形態、消化液、吸収機構の3つの進化が必要である。我々の従来の研究から、捕虫葉は既存の葉形成遺伝子の発現変化、消化酵素は既存の耐病性遺伝子を流用したのではないかと示唆された。(2)クミホソガの食草転換:食草転換には幼虫と雌親の両方に同じ餌植物に適応できるような変異が生じなければならない。これまで良い実験系が無かったが、クミホソガは異なる植物を食べる系統間で交配可能なことがわかり、予備的遺伝学的解析から少数遺伝子で食草転換が起こっている可能性が示唆された。(3)陸上植物分枝系進化:無限成長と枝分かれ機構の両方が進化することによって、被子植物が持つような複雑な茎葉体制が進化したと考えられている。我々はヒメツリガネゴケを用いた従来の研究から、ポリコム複合体 II 遺伝子がクロマチン修飾を介して、無限成長と枝分かれの両方に関わる遺伝子を同時に制御しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、新奇複合適応形質進化のケーススタディーとして、(1)食虫植物の捕虫葉、消化酵素の進化に必要な遺伝子変化の特定、(2)昆虫の食草転換において雌親と幼虫の両方が同じ餌植物に適応するような遺伝子変化の同定と野外集団内での進化動態、(3)陸上植物進化の鍵となった無限成長と枝分かれの両方の進化を同時に引き起こすような発生機構の解明を行う。また、(4)オジギソウの運動機構の分子機構解明を行い、どのような遺伝子が関与したかを推定する。これらの結果を総合し、新規複合適応形質が少数遺伝子の変化によってどのように起こりうるのかについて考察することを目的とする。

3. 研究の方法

非モデル生物である食虫植物フクロユキノシタ、コモウセンゴケ、オジギソウ、クミホソガのゲノム解読を行い、それぞれ食虫性、運動、食草転換に関わった遺伝子候補を探索する。クミホソガについては、異なる植物を食べる系統間で交配可能なことから、SNP マーカーと表現型の連鎖解析により責任遺伝子同定を行う。陸上植物の分枝系進化については、ヒメツリガネゴケポリコム複合体 II のターゲット遺伝子を ChIP-seq 法によって推定し、機能解析から枝分かれに関わる

遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 食虫植物の食虫性の進化

ムラサキヘイシソウの捕虫葉形成機構の解明

食虫植物は、小動物を“食べる”ことで貧栄養環境へ適応した植物である。小動物の捕獲には、捕虫葉と呼ばれる特殊な形の葉を利用する。捕虫葉には様々なタイプがあるが、落とし穴式の捕虫葉は袋のような形をしている。しかしながら、袋型の葉ができる形作りの仕組みは不明だった。我々は袋型捕虫葉を作る食虫植物ムラサキヘイシソウ *Sarracenia purpurea* を研究材料として、葉原基が袋型に成長していく過程を観察した。その結果、袋型捕虫葉であっても、最初期では平らな形をしていることがわかった。

シロイヌナズナなどのモデル植物を使った研究によって、平らな葉の形作りには葉の表側の組織と裏側の組織の分化が重要であることがわかっている。また、表側と裏側の細胞が作られる部位を変化させれば、ハスの葉のような盾形を含む多様な形の葉が作り出せることも知られていた。そこで次に、表側や裏側の細胞が袋型捕虫葉の葉原基のどこで分化しているかを調べるために、葉の表側に局在する遺伝子 *PHABULOSA* や裏側に局在する遺伝子 *FILAMENTOUS FLOWER* の発現部位を RNA *in situ* hybridization 法によって可視化した。その結果、予想外なことに、葉原基が袋型になる時期の表裏組織の分布は、盾状の葉とは明確に異なる一方、シロイヌナズナなどに見られる平らな葉(普通葉)のパターンと区別がつかなかった(図1)。これは、これまでに多様な葉の形を説明してきた表裏組織の分布変化とは異なる仕組みで袋型捕虫葉が作られていることを示していた。

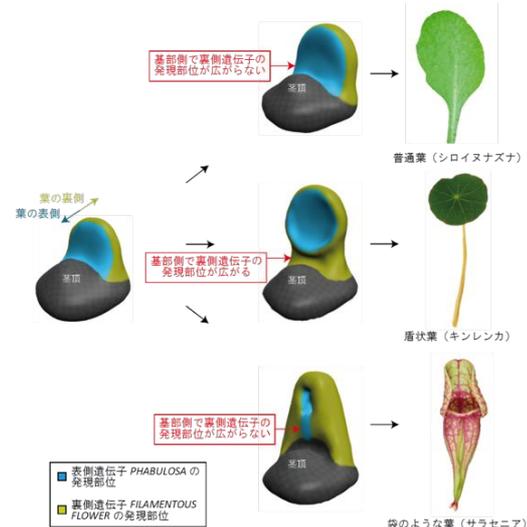


図1 葉の表側および裏側に特異的な遺伝子の発現部位の比較

次に、はじめは平らだった葉原基が徐々に袋型になっていく過程を詳細に観察したと

ころ、葉原基の先端側では周縁部が伸び出してくぼみを作り、基部側が表側方向にせり出してでっぱりを作ることがわかった。先端側と基部側ではどのような差があるのかを詳細に調べたところ、一部の組織に細胞分裂方向の違いが見つかった。くぼみを作る先端側では、ほとんどの細胞が垂層分裂（組織の表層と垂直に分裂面を作る細胞分裂）により、細胞層の面積を拡大するように増殖していたのに対し、でっぱりを作る基部側では、表側組織の内側の細胞が並層分裂（組織の表層と平行に分裂面を作る細胞分裂）により細胞層の数を増やすように増殖していた。

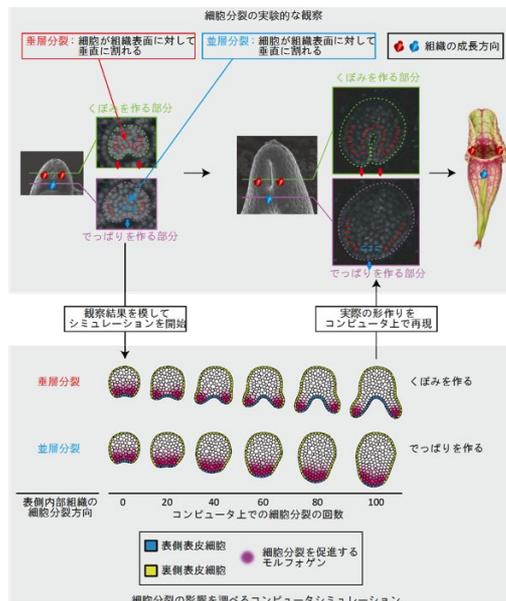


図2 葉における細胞分裂様式の観察とコンピューターシミュレーション

葉原基を模した細胞塊のモデルをコンピュータ上で作成し、観察された細胞分裂様式に従って成長させたところ、実際の捕虫葉に見られるくぼみとでっぱりを再現できたことから（図2）、葉原基先端側と基部側で異なる細胞分裂方向によって袋型捕虫葉の形作りが説明可能であると結論づけた。

本研究から、平らな形の葉からサラセニアの袋のような葉への複合適応形質の進化が、実は、葉の特定の場所で細胞分裂の方向を変えろという細胞レベルでの変化の結果として引き起こされていることがわかった。これまで他の生物と大きく異なるような形態は、どのように進化したのかよくわからなかったが、今後、細胞レベルの詳細な研究を進めることで理解できるようになる可能性がある。

#### フクロユキノシタのゲノム解読

複合適応形質としての捕虫葉の進化を明らかにするためには、捕虫葉で特異的に発現する遺伝子を解析する必要があるが、ほとんどの食虫植物は捕虫葉しか形成しないため解析が困難だった。我々は、通常葉と捕虫葉を形成するオーストラリア産のフクロユキノシタを実験材料として選び、ゲノム解析を

行った。paired-end ライブラリー、mate-pair ライブラリーを用いて、推定ゲノムサイズ 2 Gb の 100 倍にあたる配列を取得した。さらに、14 Gb の PacBio データを用いて方法開発班との共同研究によって、ギャップフィリングを行った。また、ストランド特異的 RNA-seq リードで遺伝子予測を行い、45,469 遺伝子モデルを得た。まず、温度条件を変えることによって、通常葉と捕虫葉を作りわけることに成功した。さらに、それぞれの条件で葉原基を含む茎頂分裂組織を単離し、RNA-seq で発現遺伝子の違いを解析した。捕虫葉と通常葉で発現変動していた約 130 遺伝子について、ウイルスベクターを用いた機能喪失実験を行った。その結果、いくつかの転写関連因子が捕虫葉形態形成に関わることを明らかにした。

#### 食虫植物の消化酵素進化

独立系統の食虫植物において検出された消化酵素の分子収斂について、収斂アミノ酸座位のタンパク質立体構造上での局在を解析した。その結果、消化酵素の進化においては、タンパク質分子の表面側にあるアミノ酸が分子収斂を蓄積しやすい傾向を発見した。

#### コモウセンゴケのゲノム解読

モウセンゴケ属の葉は可動性の触毛を持っている。触毛は中央部に維管束を形成する点で他の植物の毛と異なっている。そこで、触毛の起源と進化を明らかにするため、発生過程を詳細に観察したところ、触毛形成初期段階は複葉形成時と外見が似ていることがわかった。そこで、触毛形成過程において複葉形成遺伝子が発現しているかどうかを調べるために、ニュージーランド産の 2 倍体コモウセンゴケの約 500 Mb のゲノム解読を行い、葉発生段階における比較 RNA-seq 解析を行った。

#### (2) クルミホソガの食草転換

植食性昆虫の食草転換に焦点をあて、クルミホソガという小型蛾類をモデルとして、メス成虫の産卵嗜好性と幼虫の耐性の責任遺伝子を同定を行った。

クルミホソガの寄主適応遺伝子座の特定のため、クルミレースとネジキレースそれぞれのドラフトゲノム解読を行った。クルミホソガのジーンモデル推定と、発現比較解析のため、両レースに対して、幼虫全身、成虫全身、メス頭部、メス触角、オス頭部、オス触角の各部位、発育段階および性別に対して RNA-seq を行った。使用した NGS はいずれのサンプルも GAIIX であり、各サンプルともに 101 bp の paired-end で 40 M read ほどのデータを得た。責任遺伝子座の特定のため、2 つのレースの交雑から得られた backcross 世代のメスを 172 個体作成し、各個体の産卵嗜好性を調べるとともに、各個体を 300 bp のインサートサイズにて、ゲノムサイズ（推定 330 Mb）の 3 倍程度の厚みで HiSeq2000 にてシーケンシングを行った。以上の解析に

より、全 31 本のクルミホソガ染色体のうち、1 本の染色体の約 180kb のゲノム領域がネジキへの寄主転換に関わったことが推定されたため、ゲノムサイズ (推定 330 Mb) の 10 倍の規模 (384 プレート 250 枚) で Fosmid library を作成した。

以上の研究から、両レースともに N50 が数十 kb ほどの scaffolds からなるドラフトゲノムが整備でき、それらにマップ可能な発現データが蓄積できた。また、backcross を用いた順遺伝学的な解析より、幼虫が新寄主であるネジキを利用できる能力は 31 本中のたった 1 本の染色体上のごく限られた領域で決まっているが、メス親の産卵の好みはこの染色体とは異なる複数の染色体上に座乗していることが示唆された。また、産卵選好性に関わる染色体の 1 本では、同じ染色体上の複数の箇所に責任遺伝子が存在することが推定されており、産卵選好性遺伝子がまとまって存在するゲノム領域の存在が示唆された。

### (3) 陸上植物進化の鍵となった無限成長と枝分かれの両方の進化

ChIP-seq 法によって、H3K27me3 修飾される遺伝子を特定した。それらの中から、いくつかの基準のもと 15 遺伝子を選び、過剰発現することにより、無限成長と枝分かれに関わるかどうかを調べたが、顕著な表現型は得られなかった。

### (4) オジギソウの形質転換系の確立とゲノム解読

オジギソウのお辞儀運動は刺激受容、運動が連携する必要があり、典型的な複合適応形質である。お辞儀運動の分子基盤を明らかにするため、オジギソウの形質転換系を確立した。これまでオジギソウの形質転換は困難だと考えられてきたが、子葉の付け根にある子葉節を用いると形質転換効率が上がることを発見し、さらに、植物組織とアグロバクテリアを共培養するときの pH を安定化することによって遺伝子導入効率が非常に高くなることを発見した。この方法は、他の植物、例えばドクダミでも有効であることがわかった。

### (5) 非モデル植物における開花促進

進化的に興味深い複合適応形質は非モデル植物に見られる場合が多い。前述のオジギソウで成功した方法で形質転換を可能にする道が拓けたが、生殖器官に関わる形質については、生殖器官を誘導する必要がある。そこで、シロイヌナズナの花成ホルモン遺伝子 FT をドクダミで過剰発現させたところ、通常は少なくとも 3 年以上かかる開花が 2 ヶ月ほどに短縮できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

## [雑誌論文] (計 27 件) 全て査読有り

- Fukushima, K., Fujita, H., Yamaguchi, T., Kawaguchi, M., Tsukaya, H., and \*Hasebe, M. (2015). Oriented cell division shapes carnivorous pitcher leaves of *Sarracenia purpurea*. **Nat. Commun.** 6, 6450. doi: 10.1038/ncomms7450.
- Mano, H., Fujii, T., Sumikawa, N., Hiwatashi, Y., and Hasebe, M. (2014). Development of an Agrobacterium-Mediated Stable Transformation Method for the Sensitive Plant *Mimosa pudica*. **PLoS ONE** 9, e88611. doi: 10.1371/journal.pone.0088611.
- Tomescu, A.M., Wyatt, S.E., Hasebe, M., and Rothwell, G.W. (2014). Early evolution of the vascular plant body plan - the missing mechanisms. **Curr. Opin. Plant Biol.** 17C, 126-136. doi: 10.1016/j.pbi.2013.11.016.
- Xu, B., Ohtani, M., Yamaguchi, M., Toyooka, K., Wakazaki, M., Sato, M., Kubo, M., Nakano, Y., Sano, R., Hiwatashi, Y., Murata, T., Kurata, T., Yoneda, A., Kato, K., Hasebe, M., and \*Demura, T. (2014). Contribution of NAC transcription factors to plant adaptation to land. **Science** 343, 1505-1508. doi: 10.1126/science.1248417.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka, S., Higashiyama, T., Hasezawa, S., Machida, Y., and Hasebe, M. (2013). Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. **Nat. Commun.** 4, 1967. doi: 10.1038/ncomms2967.
- Sakakibara, K., Ando, S., Yip, H.K., Tamada, Y., Hiwatashi, Y., Murata, T., Deguchi, H., Hasebe, M., and Bowman, J.L. (2013). KNOX2 genes regulate the haploid-to-diploid morphological transition in land plants. **Science** 339, 1067-1070. doi: 10.1126/science.1230082.
- Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., *et al.* (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. **Science** 332, 960-963. doi: 10.1126/science.1203810.

## [学会発表] (計 30 件)

## [図書] (計 1 件)

長谷部光泰監修、秀潤社、進化の謎をゲノムで解く、2015. Pp.197.

## [その他]

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/evodevo>

<https://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/SGJHome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷部 光泰 (HASEBE, MITSUYASU)

基礎生物学研究所・生物進化研究部門・教授  
研究者番号：40237996

### (2) 研究分担者

大島 一正 (OHSHIMA, ISSEI)  
京都府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号：50466455

(3) 連携研究者

村田 隆 (MURATA, TAKASHI)  
基礎生物学研究所・生物進化研究部門・准教授  
研究者番号：00242024

(4) 研究協力者

日渡 祐二 (HIWATASHI, YUJI)  
(H23 年度まで連携研究者)